

日本産海藻の赤血球に対する溶血作用と保護作用 (2)

著者	柴田 潔, 長谷川 和清, 荒井 千明
雑誌名	日本歯科大学紀要. 一般教育系Bulletin of the Nippon Dental University. General education
巻	44
ページ	37-41
発行年	2015-03-30
URL	http://doi.org/10.14983/00000740

日本産海藻の赤血球に対する溶血作用と保護作用 II

Hemolytic and Protective Activities of Japanese Seaweed for Red Blood Cells. II.

日本歯科大学生命歯学部 柴田 潔
長谷川 和 清
日本歯科大学附属病院 荒井 千 明

Kiyoshi SHIBATA¹, Kazukiyo HASEGAWA¹ and Chiaki ARAI²

¹The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo

Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

²The Nippon Dental University Hospital

Fujimi 2-3-16, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, Japan

Eisenia bicyclis and *Undaria pinnatifida* show the protective of hemolytic activities on the sheep red blood cells and their activities do not depend on sample concentrations. The analysis of the extracts showed the facts that included many polysaccharides. Molecular weight of polysaccharides were clarified in the gel filtration chromatography.

Keywords: algae, crude extract, hemolytic activity, gel filtration

(2015年2月24日 受理)

長寿社会を迎え健康で老後を暮らす願望から、食材や産地などへのこだわりやその成分などにまで注意を払う人々が多く見受けられるようになった。島国に生きる日本人が古来より身近な健康食材として利用してきた海藻類にも目が向けられている。「海藻のネバネバ・ヌルヌルが体に良い。ネバネバは、体に良いから。」と何の根拠もないものと一笑に付されていたのであるが、近年の化学、生化学の著しい進歩により、有用な生理活性が検証され¹⁾、さらに化学構造²⁾が明らかにされるなど裏付けのあるものとなっている。

それらの中でフコイダンはコンブ・ワカメ・モズクなどの海藻の代表的な粘り成分である。フコイダンは1913年に、スウェーデンのウプサラ大学のキリンらによってヒバマタから初めて見出された物質で、アルギン酸やカラギナン、寒天といったものと同じように

海藻特有の多糖類であるが、褐藻類にのみ含まれる³⁾。

一般的に使用されるフコイダンという名称は、主成分がフコースである多糖類の総称を指しており、他にガラクトース、マンノース、キシロースやウロン酸などの成分も含まれており、海藻個々により成分組成や構造が異なり様々である。そのため大まかに、分子量1万以上の高分子の物質であり、フコースが主成分である事、硫酸基やウロン酸が結合していることなどを満たすものを指すものを健康食品業界などでは、高分子フコイダンと呼んでいる。さらに、その酵素や化学反応による分解物を低分子フコイダンと言う場合もあるようだ。フコイダンの生理作用に関する主な作用は培養細胞や実験動物を使った基礎研究の段階であり、癌細胞に対する延命効果⁴⁾や、炎症反応⁵⁾、免疫反応、血管新生作用などに対する抑制効果が報告されている

が、臨床研究への応用が待たれる。

筆者らは、赤血球の溶血活性を有する藻種に固有の有機化合物を対象にスクリーニングを行ってきたが、その過程においても溶血活性が濃度依存的でなく変化する試料がみられた。すなわち、前報⁶⁾で褐藻に分類されるアラメ、ワカメなどの試料での濃度に依存しない溶血作用の変化で、海藻に含まれる粘着多糖類の存在により特定濃度で溶血活性が減少していると思われる結果について、本報告では、保護作用の解明を目的として糖の定性・定量分析を行うとともに、活性物質の構造に関する新たな知見が得られたので以下に報告する。

材料と方法

試料の調製

1) 海藻の採取

本研究に用いたアラメ (10, *Eisenia bicyclis*) は、1999年12月15日に神奈川県横須賀市天神島より、ワカメ (118, *Undaria pinnatifida*) は、2000年4月23日に茨城県ひたちなか市平磯より採集した後、-21℃にて凍結保存し、必要に応じ解凍しものである。

2) 溶血活性の測定

① 評価試料の調製

凍結保存していた各種藻類試料を室温において自然解凍し、付着物を除去した後、表面の水分を除き、0.3 g (湿重量) を秤量した。次いで、藻片を油圧プレス (500kg/cm², 全圧力 5 t) にて粉碎し、ペースト状にした。これを乳鉢に移し、生理食塩水を加え粉碎した。次いで、生理食塩水を加えて攪拌し、最終濃度を葉片 0.1 g に対し生理食塩水 1.5 ml (0.3g / 4.5 ml) に調整した。この藻片懸濁液を綿栓濾過し、粗抽出物原溶液 (非希釈試料、以下 '1/1' と表記) とした。

評価対象海藻 1 種について、4 倍希釈法により順次希釈し、試料濃度 1/4、1/16、1/64 の各濃度の評価試料を調製した。

② 血球懸濁液の調製

ヒツジ無菌脱繊維素全血 (血球数およそ $320 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Sheep Whole Blood Defibrinated Sterile) 3ml に生理食塩水 3ml を加え攪拌し、遠心機 (國産遠心器 H18-A) を用いて遠心分離 (3000rpm、3min) 後、駒込ピペットで上澄みを除去した。この操作を 3 回繰り返した後、残渣部分に生理食塩水を加え総量を 2ml とした。これにより血球数は、およそ $500 \times 10^4/\mu\text{l}$ となった。

③ 吸光度による溶血活性の測定

藻類 1 種につき、遠心管 6 本に生理食塩水 3640μl を分注し、それぞれに赤血球母液 160μl を加えた。これに、3 段階の濃度の評価試料 (1/1、1/4、1/16) を、各濃度 2 本としてそれぞれ 200μl 分注した。これらを攪拌機にて攪拌し、室温 (約 23℃) 下で 60 分間静置した。これを溶血試料として、遠心分離 (3000rpm、30sec) により血球やその残渣を沈殿させ、上澄み 3ml を石英セルに移し、三木らの方法⁹⁾に従い 541nm および 576nm における吸光度を分光光度計で測定した。

評価試料を添加した溶血試料のコントロールとして、同一濃度の評価試料 200μl と生理食塩水 3800μl を混合のうえ攪拌した後、遠心分離 (3000rpm、30sec) して得た上澄を用い、他試料との比較時の着色の影響を排除した。

また、溶血活性の陽性試料として、一次希釈液調整時に、生理食塩水の代わりに純水を用いたものを溶血判定の 100% として数値化した。

使用機器：分光光度計 U-2810 日立製作所製

3) 物理化学的性状の測定

① 測定用試料調整

採取した海藻解凍後、付着する水を拭き取り 48 ~ 96 時間減圧乾燥した。乾燥した海藻を大まかに破碎後、家庭用ミルミキサーを用いて粉碎し 60 メッシュ (0.25mm) 以下のものを粗粉末とし、それ以上のものは、再度ミルミキサーにより粉碎した。得られたアラメ粗粉末に蒸留水を加え、室

温て攪拌放置した。これを遠心分離し上清と残渣に分離し上清を可溶性分画、残渣を不溶性分画とした。

次いで、不溶性分画はそのまま冷凍保存し、可溶性分画は減圧下濃縮し冷凍保存し必要に応じて解凍し測定試料とした。

②フェノール・硫酸法による全糖量の定量⁷⁻⁸⁾

試料に含まれる糖質の総量を標準物質にグルコースを用い、フェノール・硫酸法によりグルコース相当量として算出した。すなわち、対象試料を試験管にとり、5% フェノールと特級濃硫酸を加え攪拌し、室温で 20 分程放置した後、490nm で吸光度を測定した。グルコースを用いた標準直線は、200 μ l から倍々希釈法にて得られた濃度と吸光度より求め、全糖量を算出した。

③ゲル濾過法 (Gel Filtration Chromatography) による分子量測定

水系で使用できる多細孔を有するポリマー (TSK-gel G4000PW) を担体を選び HPLC を行っ

た。測定と同一条件 (0.2mol - リン酸緩衝液 pH 6.8, 1.0ml/min) で、保持時間と推定分子量の関係を明らかにするため、デキストラン T-2000, T500, T70, T20 を混合した標準試料を用い示差屈折率検出器を用い測定し溶出曲線を求めた。次いで、**海藻から得られた可用性分画 (20 μ l) をマイクロシリンジで秤取り、分子量測定を行った。検出は、先と同様に示差屈折率検出器で行った。**

結果と考察

凍結保存していた各種藻類試料を室温において自然解凍し、表面の水分をキムワイプで除き、0.3 g (湿重量) を秤量した。これらから実験項に記載した方法により処理し、粗抽出物溶液 (非希釈試料、以下 '1/1' と表記) を得た。これを 4 倍希釈法により順次希釈し、4 段階の試料濃度を調製し、評価試料とした。すなわち、試験管 3 本にそれぞれ生理食塩水 600 μ l を分注後、第一の試験管に非希釈試料 (1/1) 200 μ l を加え攪拌機で攪拌し、濃度を 1/4 とした溶液を得た。次いで、第二の試験管に第一試験管の溶液 (1/1) 200 μ l を分取し加え、攪拌機で攪拌した。さらに、同様の操作を繰り返すことにより、試料濃度 1/4、1/16、1/64 の各濃度の評価試料を調製した。

スジアオノリ (41) では図 1. に示したように 541nm の吸光度から算出される溶血活性は、43.8% (1/1)、11.7% (1/4)、2.6% (1/16)、0.4% (1/64) と濃度依存的に変化した。これと比較して、アラメ (10) では吸光度から算出される溶血活性は、35.2% (1/1)、-5.6% (1/4)、2.3% (1/16)、0.3% (1/64) と変化している。同様に、ワカメ (118) では、29.7% (1/1)、-8% (1/4)、0% (1/16)、0.2% (1/64) と濃度依存的に変化した。いずれの海藻も溶血活性を有することは明らかであるが、スジアオノリ (41) で見られる様な溶血活性物質の濃度に依存するような直線関係であるのに対して、アラメ (10) 及びワカメ (118) のグラフは低濃度で一度溶血活性がマイナスとなった後、直線関係となっ

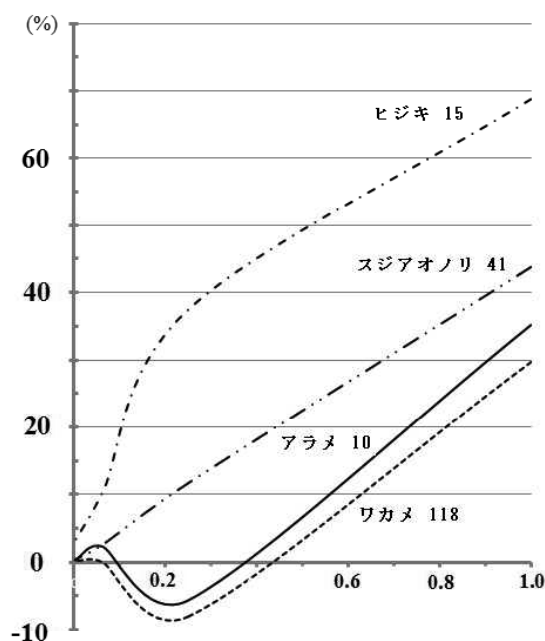


図 1. 各種海藻の溶血活性

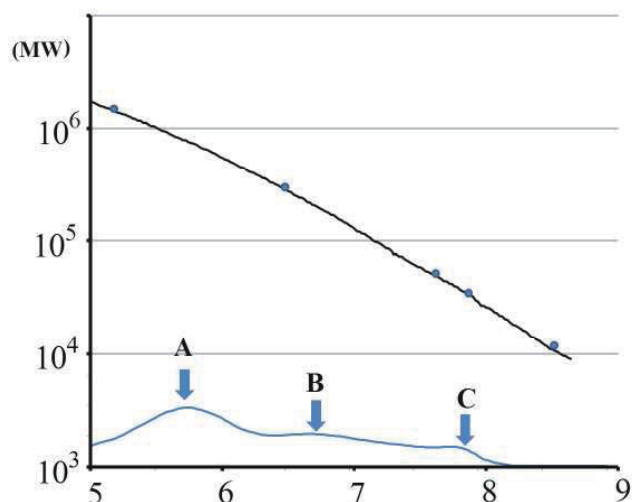


図2. アラメのゲル濾過法適用時のHPLCクロマトグラム

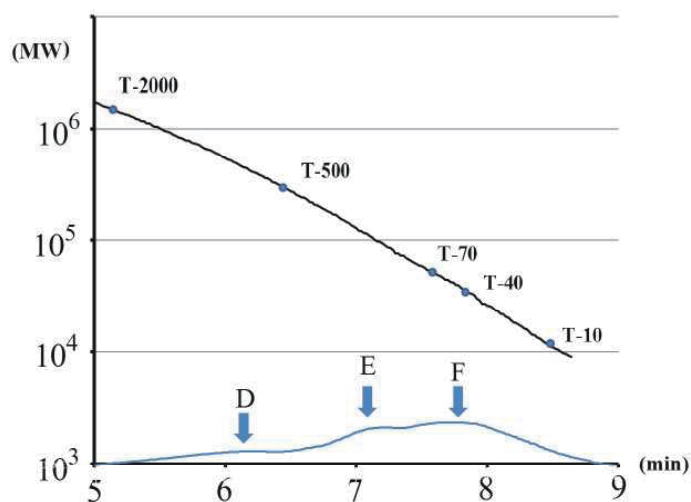


図3. ワカメのゲル濾過法適用時のHPLCクロマトグラム

ている。本研究では、溶血活性0%とは、**生理食塩水中で30分保存したときの溶血活性を便宜的に0%**として海藻の溶血活性を判定しているの、生理食塩水による溶血が無いと判断したわけでは無い。そのことから、物質により生理食塩水によるバックグラウンドとしてとらえられていた溶血作用を、何らかの影響で押さえることになればマイナスの値になることがあるものと推察される。すなわち、低濃度の1/64では保護作用を示す物質の濃度が低く通常の溶血作用が見られるが、1/16の濃度で保護作用が現れその後ほぼ直線関係となっているものと推定した。一定濃度以上で活性が発現しその後、海藻に含まれる溶血成分の濃度に従い溶血活性が上昇しているものと思われる。ヒジキ(15)については、溶血作用が高く、保護作用が明確には現れていない。

保護作用を示す物質の物理化学的性状を明らかにするため、高濃度に可溶成分が含まれる試料を調整した。保存試料を解凍後、付着する水を拭き取りアラメ(10)は96時間、ワカメ(118)は48時間、室温にてデシケーター内で減圧乾燥した。乾燥試料を大まかに破碎後、家庭用ミルミキサーを用いて粉碎し60メッシュ(0.25mm)以下のものを粗粉末とした。

得られたアラメ粗粉末(500mg)に蒸留水(100ml)を加え、室温にて攪拌放置(76hr)した。その後、溶液を遠心分離(300rpm, 15min)し、上清と残渣に分離し上清を可溶性分画、残渣を不溶性分画とした。次の

で、可溶性分画は10mlずつ小分けして冷凍保存し必要に応じて溶解し測定試料とした。また、不溶性分画は蒸留水を10mlとなるまで加え、1mlずつに分け冷凍保存した。乾燥に用いる海藻の種類や部位により脱水の状態が異なり、上記時間は目安としている。また、乾燥の外観も保存状態により異なり、保存により水溶性の低分子糖類の消失は否めないものと思われる。

次いで、上記で得られた水溶性分画について、フェノール・硫酸法により全糖量を求めた。すなわち先に得られたアラメ(10)の可溶性分画をとして保存した試料を解凍後、倍々希釈法により蒸留水で測定試料を希釈し原液及び濃度1/2、1/4、1/8、1/16の各段階とした。次いで、各測定試料1.0mlに5%-フェノール水溶液を1.0ml加え攪拌後、濃硫酸5.0mlを直接滴下するように加え再度攪拌し、10分間放置した。溶液が、黄色から黄褐色に変化を確認後、490nmでの吸光度を測定した。これを、200 μ g/mlのグルコース水溶液を用い倍々希釈法により定めた検量線と比較して、全糖量をグルコース相当量で算出した。その結果、アラメ(10)では50mg中グルコース相当量で35.9mgの糖質が含まれており、同様に、ワカメ(118)では、13.5mgの糖質が含まれていることが明らかになった。しかしながら、これまでの知見から、同一種であってもまた、同一の個体でも収穫時期や場所などによる糖質含有量の変動が知られており、上記値は確定した値ではないものの、本研究における活性物質の探求にお

いては、主体となるものが糖質であることを示しており意味があるものととらえている。

アラメ (10) とワカメ (118) は、いずれも褐藻に分類され細胞壁骨格多糖としてセルロース、細胞間粘質多糖としてアルギン酸やフコイダンまた貯蔵多糖としてラミナランなどを海藻内に含んでいることが知られており、いずれもが高分子多糖類であることが知られている。

そこで、水系で使用できる多細孔を有するポリマー (TSK-gel G4000PW) を担体を選び HPLC にてゲル濾過法 (Gel Filtration Chromatography) によるおよその分子量測定を行った。最初に、測定と同一条件 (0.2mol-リン酸緩衝液 pH 6.8, 1.0ml/min) で、保持時間と推定分子量の関係を明らかにするために、デキストラン T-2000, T500, T70, T20 を混合した標準試料を用い、示差屈折率検出器を用い保持時間を測定し溶出曲線を求めた。アラメ (10) の溶出曲線を図 2 に示した。主に A,B そして C とした部分を中心とするピークが見られ、それぞれの保持時間からの近似曲線式よりおよその分子量が A : 120Kd、B : 40Kd、C:7Kd であることが、また、存在比は、A : B : C = 63.5 : 24.4 : 12.1 となり、分子量の大きな A が主成分となっていることが明らかになった。同様にワカメ (118) は、D、E、F の 3 種のピークが見られ、およその分子量は、D : 70Kd、E : 30Kd、F : 7Kd であった。また、その存在比は、D : E : F = 8.7 : 32.7 : 58.6 となった。

これらの結果から、アラメ (10) とワカメ (118) に含まれる溶血活性を妨げている主な成分は高分子の多糖類であることが推定されるが、その分子量が異なっている。しかしながら、これまでの知見から種固有のものであるが構成している単糖については変化が無いことが予想される。このことから、今後、多糖鎖を構成する単糖の違いを明らかにするために、それぞれのピークに当たる物質を分収した後、加水分解を行いイオンカラムクロマトグラフィーなどで解析を行いたい。

謝 辞

海藻の採取および種同定について助言下さいました

東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科藻類学研究室の田中次郎教授に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、傘孝之教授ならびに南雲保教授には、多大なるご配慮を賜りました。

引用文献

- 1) 西野貴司, 名雲照一. 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用. 日本農芸化学会誌, **61**, 3, 361-363 (1987)
- 2) Taichi Usui, Katsuko Asari, Takashi Mizuno. Isolation of highly purified "Fucoidan" from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric. Biol. chem.*, **44**, 8, 1965-1966 (1980)
- 3) 海藻フコイダンの科学. 著者 山田信夫. 成山堂書店. 2006
- 4) Yoshinobu Aisa, et al. : Fucoidan induces Apoptosis of Human HS-Sultan Cells Accompanied by Activation of Caspase-3 and Down-Regulation of ERK Pathways *American Journal of Hematology* **78** : 7-14, 2005
- 5) Satomi Yoshiko and Nishino Hoyoku (2007). "Fucoxanthin, a Natural Carotenoid, Induces G1 Arrest and GADD45 Gene Expression in Human Cancer Cells.". *In vivo* **21** (2): 305-309. PMID 17436581
- 6) 柴田潔, 長谷川和清, 荒井千明 : 日本産海藻の赤血球に対する溶血作用と保護作用 : 日本歯科大学紀要, 一般教育系, **38** : 51 - 56, 2009
- 7) 福井作蔵 : 還元糖の定量法, 東京大学出版会 1969
- 8) Whistler, R. L. et al.: *Methods in carbohydrate chemistry I*, p.388, Academic press 1962.